Agilent 1120 Compact LC を用いたプラバスタチンナトリウムの USP 純度分析

アプリケーション

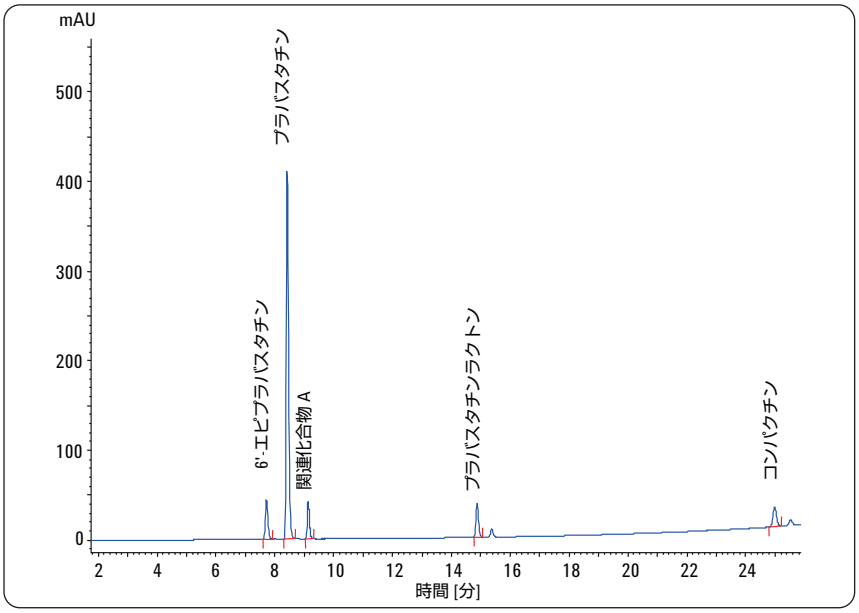
製造 QA/QC

著者

Syed S. Lateef, Siji Joseph

Agilent Technologies

Bangalore, India



概要

プラバスタチンナトリウムはコレステロール合成を抑制する効果を持ち、循環器疾患の予防に役立ちます。米国薬局方の定めるプラバスタチンナトリウム純度分析のクロマトグラフィメソッドを、Agilent 1120 Compact LC で実施し、システムの適合性パラメータを検証しました。プラバスタチン 1,1,3,3-テトラメチルブチルアミンと関連化合物 A と呼ばれる不純物を含むシステム適合性テストミックスの分離能は 6.3 で、2.0 以上とする許容値を大きく上回りました。Agilent 1120 Compact LC の検出器は、0.09 µg/mL までの濃度の関連化合物 A を直線レスポンスで検出しました。

Agilent Technologies

はじめに

プラバスタチンナトリウムの純度分析用の USP クロマトグラフィメソッド 1 を Agilent 1120 Compact LC で実施し、システムの適合性パラメータを検証しました。システム適合性テストサンプルは、USP プラバスタチン1,1,3,3-テトラメチルブチルアミンと USP 関連化合物 A で構成されます。関連化合物 A は、不純物 3α-ヒドロキシイソコンパクチンのナトリウム塩です。プラバスタチンナトリウムと関連化合物 A は、位置異性体の関係にあります (図 1)。

プラバスタチンナトリウムの不純物には、USP で報告された以下の 6 つの化合物があります：

1. 3″-ヒドロキシプラバスタチン
2. 6′-エピプラバスタチン
3. 3α-ヒドロキシイソコンパクチン (関連化合物 A)
4. ペンタノイル不純物
5. プラバスタチンラクトン
6. コンパクチン

不純物 2、3、5、6 のみを用いて、Agilent 1120 Compact LC で不純物分析メソッドを実施しました。

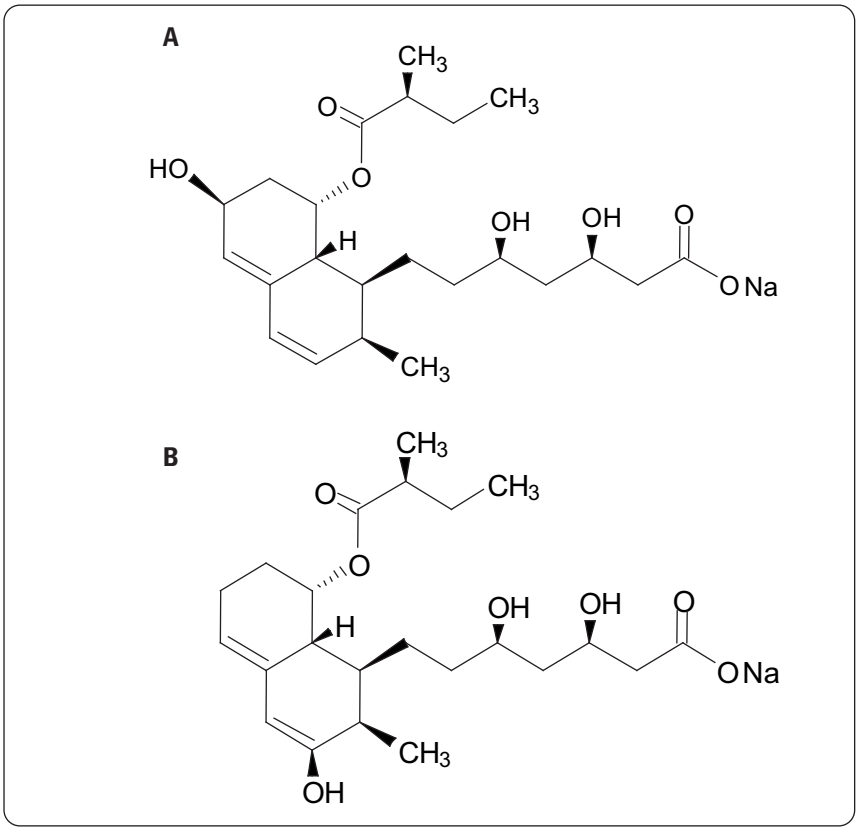


図 1
A) プラバスタチンナトリウム B) USP 関連化合物 A

実験手法

サンプル前処理

- **希釈：A** メタノールと水の1:1の混合液を作成しました。メタノールは HPLC グレードです (J.T. Baker)。実験には Milli-Q 水 (Millipore) を使用しました。
- **システム適合性テストサンプル：**プラバスタチン 1,1,3,3-テトラメチルブチルアミンと関連化合物 A を希釈液で希釈し、プラバスタチン 1,1,3,3-テトラメチルブチルアミンの濃度を 0.6 mg/mL、関連化合物 A の濃度を 0.001 mg/mL としました。このシステム適合性テストサンプルを用いて、関連化合物 A とプラバスタチンの相対保持時間 (RRT) を測定しました。プラバスタチン 1,1,3,3-テトラメチルブチルアミンと関連化合物 A は、いずれも USP から入手しました。
- **標準サンプル：**プラバスタチン 1,1,3,3-テトラメチルブチルアミンを希釈液で希釈し、濃度 1.25 µg/mL としました。この標準サンプルを用いて、ピーク面積の相対標準偏差 (RSD) を測定しました。
- **RRT テストサンプル：**プラバスタチンナトリウムと 4 つの不純物 (6′- エピプラバスタチン、関連化合物 A、プラバスタチンラクトン、コンパクチン) を希釈液で希釈し、プラバスタチンの濃度を 65 µg/mL、不純物の濃度を 7.5 µg/mL としました。この RRT テストサンプルを用いて各不純物の RRT を測定し、USP で報告されている値と比較しました。プラバスタチンラクトンとコンパクチンは VARDA Biotech から入手しました。関連化合物 A は USP から、6′-エピプラバスタチンは欧州薬局方 (EP) から入手しました。
- **検出器直線性テストサンプル：**関連化合物 A を0.09 µg/mL～1.20 µg/mL までの 7 種類の濃度でプラバスタチンナトリウムサンプルに添加しました。プラバスタチンナトリウムの濃度は常に 0.5 mg/mL です。このサンプルを用いて、不純物濃度が低い場合における検出器の線形レスポンスを検証しました。

使用機器

以下を搭載した Agilent 1120 Compact LC システム：

- バイナリポンプ（内蔵オンラインデガッサ)
- 100サンプルトレイオートサンプラ
- 可変波長型検出器 (VWD)

機器のコントロールには、Agilent EZChrom Elite Compact ソフトウェアを使用しました。

結果と考察

システム適合性テスト結果

プラバスタチンナトリウムに関する USP の記載によれば、プラバスタチン 1,1,3,3-テトラメチルブチルアミンと関連化合物 A を含むシステム適合性テストサンプルの分離能は、2.0 以上 (NLT)、関連化合物 A の RRT は約 1.1 でなければならないとされています (RRT はピーク同定でのみ役立つ指標であるため、許容基準は適用されないと USP は説明しています)。

図 2 に、システム適合性テストサンプルを 6 回にわたって繰り返し注入した結果を示しています。すべての分析で関連化合物 A の RRT が 1.1 となっているのがわかります。分離能は 6.3 で、これは NLT 2.0 という USP の許容基準値を上回っています。

プラバスタチンのピーク面積の標準偏差

1.25 µg/mL のプラバスタチン 1,1,3,3-テトラメチルブチルアミンを含む標準サンプルを 6 回にわたって注入し、プラバスタチンのピーク面積の標準偏差を調べました。USP メソッドでは、標準サンプルの 6 回繰り返し注入におけるピーク面積の相対標準偏差は、10.0 %以下 (NMT) でなければならないと定められています。この実験で得られた 0.3 % という RSD 値は、Agilent 1120 Compact LC のインジェクタの精度が優れていることを示してい

パラメータ	詳細	
VWD 波長	238 nm	
カラム	Agilent ZORBAX SB-C18、4.6 x 75 mm、3.5 µm	
希釈液	50:50 メタノール：水	
注入量	10 µL	
ニードル洗浄	希釈液を入れた洗浄バイアルにて3 秒間	
サンプル温度	室温	
カラム温度	25 °C	
移動相	バッファ pH 7.0：トリエチルアミンで pH 7.0に調節した 0.08 M リン酸溶液	
バッファ A：	水：バッファ pH 7.0：アセトニトリル (52:30:18)	
バッファ B：	水：バッファ pH 7.0：アセトニトリル (10:30:60)	
グラジエント	時間	% バッファ B
	0	0
	3.0	0
	26.5	100
	26.6	0
	30	0
ポストタイム	3 分	
流量	1 mL/min	

表 1
機器パラメータ

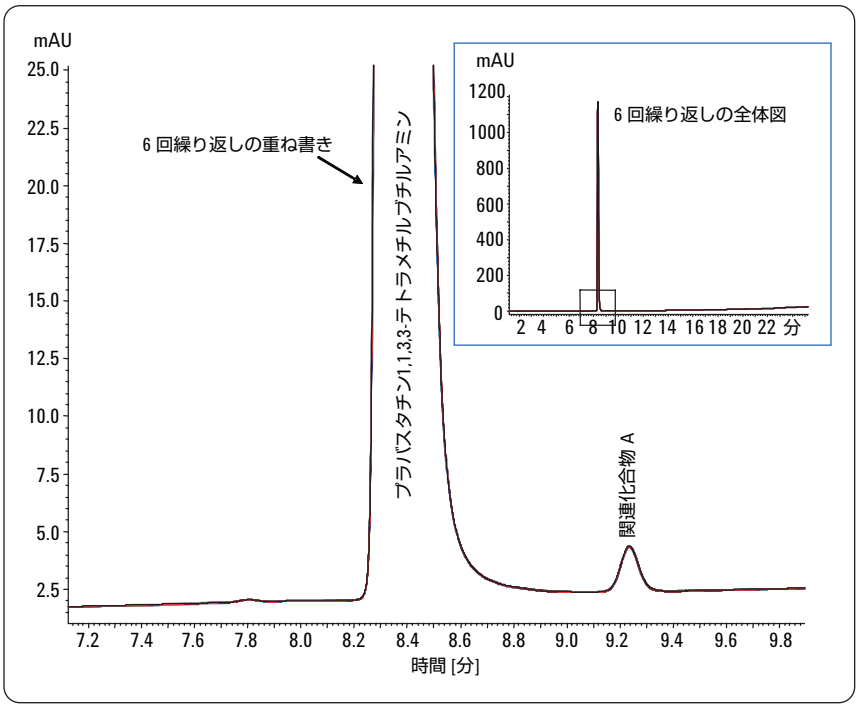


図 2
システム適合性サンプルの 6 回繰り返し注入の重ね書き。挿入図は、繰り返し注入の全体図を示しています。

ます。図 3 に、標準サンプルの 6 回注入で得られた結果を示しています。

プラバスタチンの保持時間に対する不純物の保持時間

図 4 に、USP に記載されたプラバスタチンのクロマトグラフィ純度テストに則って分析した RRT テストサンプルのクロマトグラムを示しています。このテストをもとに RRT を算出し、USP に記載された RRT と比較しました。表 2 に、比較結果を示しています。実験で得られた RRT と USP に記載された RRT が良好に一致しています。

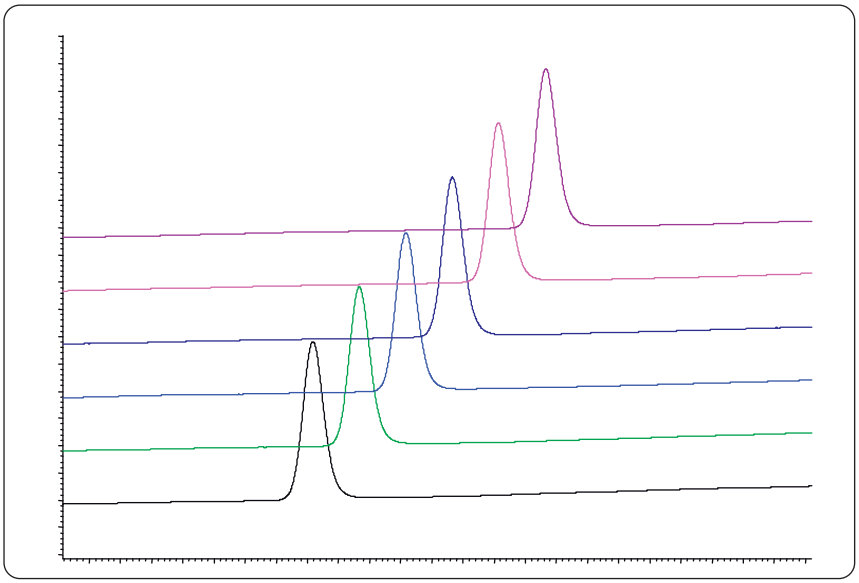


図 3
標準サンプルの 6 回繰り返し注入 (x および y 軸オフセット)

化合物名	USP 記載の相対保持時間	実験で得られた相対保持時間
3″-ヒドロキシプラバスタチン	0.33	-*
6′-エピプラバスタチン	0.92	0.91
3α-ヒドロキシイソコンパクチン	1.1	1.1
ペンタノイル不純物	1.2	-*
プラバスタチンラクトン	1.8	1.8
コンパクチン	3.1	3.1

表 2
USP メソッドに記載された 6 つの不純物のうち 4 つの RRT 測定値

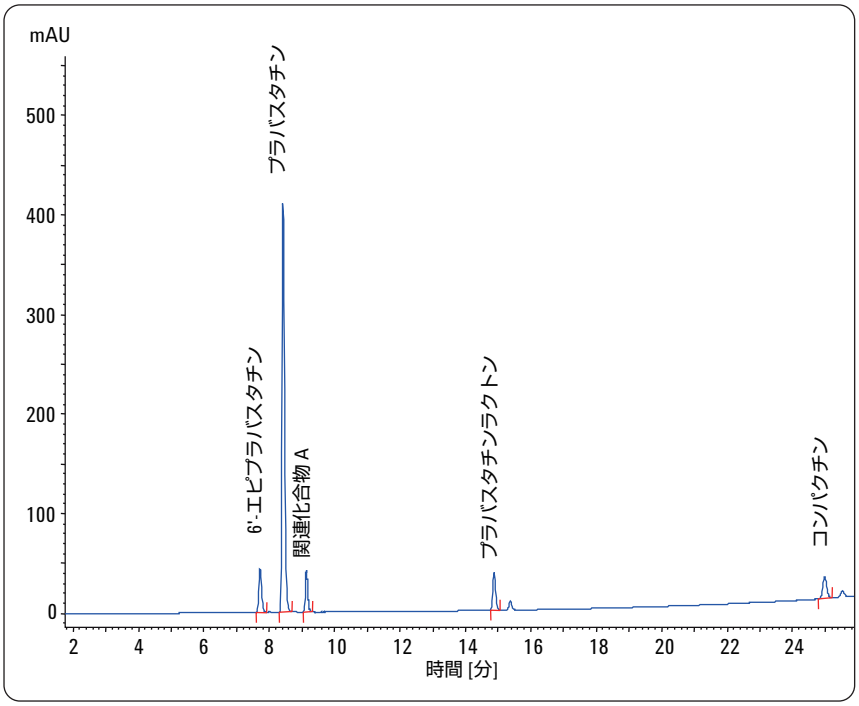


図 4
RRT テストサンプルのクロマトグラム。プラバスタチンラクトンとコンパクチンの間のピークは不純物から生じています。

検出器直線性テストの結果

USP メソッドでは、関連化合物 A の濃度上限が 0.2% と定められています。したがって、プラバスタチンナトリウム溶液の濃度が 0.5 mg/mL の場合、関連化合物 A の濃度上限は 1 µg/mL になります。低濃度における検出器の直線レスポンスを検証するために、0.09 µg/mL～1.20 µg/mL の関連化合物 A を 0.5 mg/mL のプラバスタチンナトリウムに添加しました。表 3 に、各添加濃度で得られたシグナル/ノイズ比 (S/N) を示しています。添加濃度 0.17 µg/mL (0.034 % に相当) が定量下限 (LOQ) です。図 5 に、各注入濃度のクロマトグラムの重ね書きを表示しています。各注入濃度で均一に上昇していることが見てとれます。このことは、Agilent 1120 Compact LC の検出器レスポンスが優れていることを示しています。各注入濃度の直線性プロットを図 6 に示しています。直線性の相関係数 (R^2) は 0.998です。

濃度	関連化合物 A、 単位 µg/mL (不純物 %)	S/N 比 (ASTM)	保持時間の RSD (n=3)	面積の RSD (n=3)
1	0.09 (0.018 %)	6.39	0.02	3.52
2	0.17 (0.034 %)	10.46	0.01	4.15
3	0.33 (0.066 %)	19.38	0.01	0.80
4	0.60 (0.120 %)	33.98	0.01	0.82
5	0.83 (0.166 %)	60.55	0.01	0.62
6	1.03 (0.206 %)	70.18	0.04	0.61
7	1.20 (0.240 %)	81.53	0.03	0.59

表 3
許容値を上回る濃度と下回る濃度で関連化合物 A を添加。
許容濃度は、プラバスタチン濃度 0.5 mg/mL をもとに算出しました。

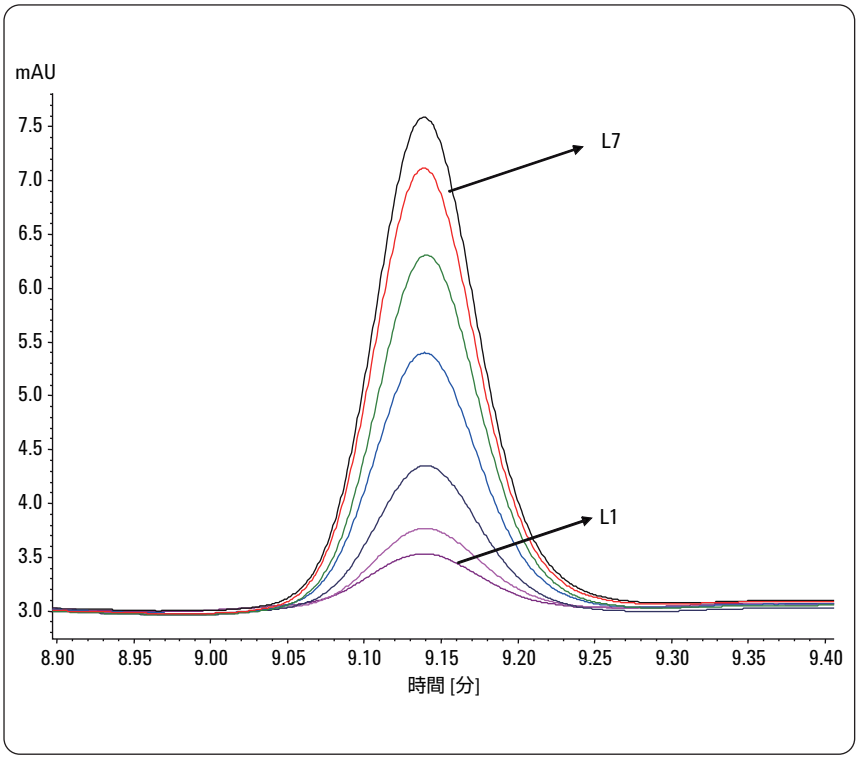


図 5
関連化合物 A の検出器直線性テストで得られたクロマトグラムの重ね書き。
均一に重なったクロマトグラムは、検出器レスポンスの直線性を示しています。

結論

USP に記載されたプラバスタチンナトリウムのクロマトグラフィ純度分析メソッドを Agilent 1120 Compact LC システムで実施しました。システム適合性テストでは、分離能6.3という良好な結果が得られました。標準サンプルの繰り返し注入により、低濃度のプラバスタチンにおける注入精度が示されました。面積の RSD は0.3% という優れた値でした。許容値よりも低い濃度における関連化合物 A の直線性 (R^2) は 0.998 でした。この結果は、検出器レスポンスが優れていることを示しています。

USP メソッドでは、メソッドの有効性が確認されており、妥当性の再確認は求められていませんが、メソッドの簡単な妥当性確認は必要とされています。本研究の結果は、Agilent 1120 Compact LC におけるこの USP メソッドの有効性が実証されたことを示しています。

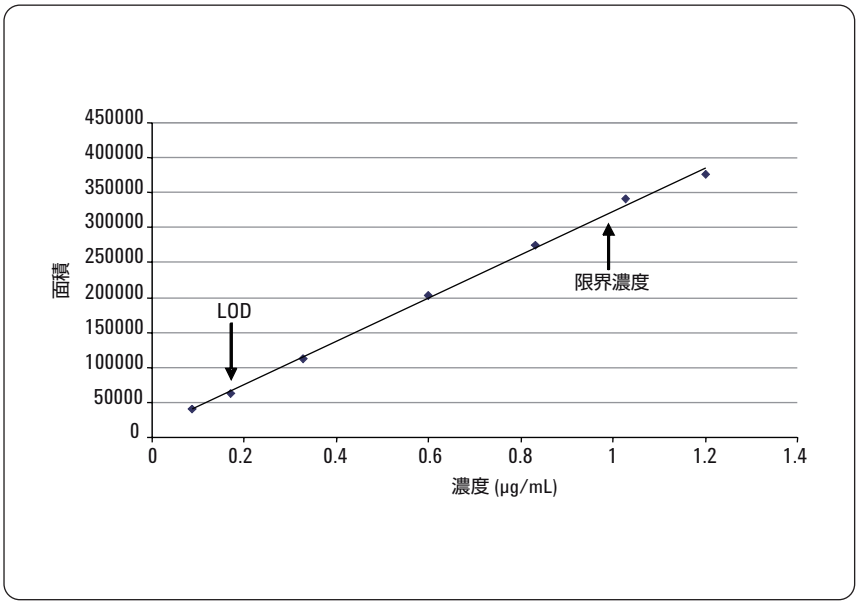


図 6
0.09 µg/mL〜1.20 µg/mL で添加した関連化合物 A の検出器レスポンスの直線性

参考文献

1.
U.S. Pharmacopeia 31-NF 26, second supplement, **2008.**

http://www.uspnf.com/uspnf/pub/index?usp=31&nf=26&s=1

本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。また、本文書掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

www.agilent.com/chem/jp

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2008
Published November 1, 2008
Publication Number 5989-9869JAJP

Agilent Technologies